

JP11318461

Publication Title:

HUMAN NEUROPSIN, ITS DNA SEQUENCE, ITS GENE AND ITS PRIMER

Abstract:

Abstract of JP11318461

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new human neuropsin exhibited by a specific amino acid sequence, specifically expressed in the cerebral hippocampus and useful for the elucidation of the mechanism of human brain and development of therapeutic medicines for brain disorders. **SOLUTION:** This new human neuropsin is shown by an amino acid sequence of formula I. The DNA sequence encoding this human neuropsin is expressed by a base sequence of formula I. The gene for this human neuropsin consists of 6 exons and 5 introns. The 6 exons are shown by base Nos.1-26, Nos.27-104, Nos.105-264, Nos.26-27, Nos.528-661 and Nos.662-868 of the base sequence of formula I, respectively. The promoter region is shown by a base sequence of formula II. The primer of this human neuropsin is shown by the base sequence such as GTGACCCCGC-CCCTGGATT.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-318461

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/47

C 1 2 N 9/76

C 1 2 N 9/76

// A 6 1 K 38/00

A A B

A 6 1 K 37/02

A A B

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願平10-133615

(22) 出願日

平成10年(1998) 5月15日

(71) 出願人 59503/227

塩坂 貞夫

奈良県生駒市真弓南 1-6-33

(71) 出願人 390004097

株式会社医学生物学研究所

愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5 番 10 号

住友商事丸の内ビル 5 F

(72) 発明者 塩坂 貞夫

奈良県生駒市高山町8916-5 奈良先端科学技術大学院大学内

(72) 発明者 吉田 成孝

奈良県生駒市高山町8916-5 奈良先端科学技術大学院大学内

(74) 代理人 弁理士 足立 勉

(54) 【発明の名称】 ヒトニューロプシン、そのDNA配列、その遺伝子、及びそのプライマー

(57) 【要約】

【課題】 脳の海馬に特異的に発現されている新規なヒトニューロプシン、そのDNA配列、その遺伝子及びそのプライマーを提供する。

【解決手段】 脳の海馬に特異的に発現する新規なヒト

ニューロプシン（下記表のアミノ酸配列で表される蛋白質）は、神経系の細胞の増殖、情報伝達、さらには脳の機能などに関する研究に貢献すると考えられる物質である。

【表 1】

Met Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Ala Lys Thr Trp Met Phe Leu Leu
Leu Leu Gly Gly Ala Trp Ala Gly His Ser Arg Ala Gln Glu Asp Lys
Val Leu Gly Gly His Glu Cys Gln Pro His Ser Gln Pro Trp Gln Ala
Ala Leu Phe Gln Gly Gln Gln Leu Leu Cys Gly Gly Val Leu Val Gly
Gly Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Lys Tyr Thr
Val Arg Leu Gly Asp His Ser Leu Gln Asn Lys Asp Gly Pro Glu Gln
Glu Ile Pro Val Val Gln Ser Ile Pro His Pro Cys Tyr Asn Ser Ser
Asp Val Glu Asp His Asn His Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Arg Asp
Gln Ala Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Pro Ile Ser Leu Ala Asp His
Cys Thr Gln Pro Gly Gln Lys Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Val
Thr Ser Pro Arg Glu Asn Phe Pro Asp Thr Leu Asn Cys Ala Glu Val
Lys Ile Phe Pro Gln Lys Lys Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Gly Gln Ile
Thr Asp Gly Met Val Cys Ala Gly Ser Ser Lys Gly Ala Asp Thr Cys
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asp Gly Ala Leu Gln Gly
Ile Thr Ser Trp Gly Ser Asp Pro Cys Gly Arg Ser Asp Lys Pro Gly
Val Tyr Thr Asn Ile Cys Arg Tyr Leu Asp Trp Ile Lys Lys Ile Ile
Gly Ser Lys Gly

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示されるヒトニューロプシン。

【請求項2】 配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードするヒトニューロプシンのDNA配列。

【請求項3】 配列表の配列番号1の塩基配列で示されるヒトニューロプシンのDNA配列。

【請求項4】 6つのエクソンと5つのイントロンからなり、前記6つのエクソンはそれぞれ配列表の配列番号1の塩基配列の1～26番、27～104番、105～264番、265～527番、528～661番、662～868番であるヒトニューロプシンの遺伝子。

【請求項5】 プロモータ領域が配列表の配列番号2の塩基配列で示される請求項5記載のヒトニューロプシンの遺伝子。

【請求項6】 配列表の配列番号3～10のいずれかの塩基配列で示されるヒトニューロプシンのプライマー。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、脳の海馬に特異的に発現されている新規なヒトニューロプシン、そのDNA配列、その遺伝子及びそのプライマーに関する。

【0002】

【従来の技術】最近の研究により、脳におけるセリンプロテアーゼの重要な役割が明らかになってきた。例えば神経の可塑性におけるアスミノゲンアクチベータやエグジトトキシン(exitotoxin)による神経損傷などである。ニューロプシンは当初マウスの海馬から単離されたセリンプロテアーゼであるが、生化学的な分析により、ニューロプシンが実際にはトリプシン様の基質特異性を持つ蛋白分解活性を持つことが明らかになった。さらに、ニューロプシンに特異的な抗体は、興奮によって引き起こされるてんかん発作の進行を引き延ばした。ニューロプシンのmRNAの量は化学的に誘導された虚血性障害の後の記憶の保持能力に関係している。この蛋白は又、長期増強の誘導をも修正する。このことから、ニューロプシンは神経の可塑性において重要な役割を担っている。さらに、ニューロプシンのmRNAは脳や皮膚、発達途中の妊婦の子宮といった多様な臓器において発現されている

ところで、特開平8-311099号公報には、マウスのニューロプシンが開示されている。すなわち、この公報によれば、神経成長因子であるNGF- α のセリンプロテアーゼドメインに特異的に保存されている2カ所の領域すなわちヒスチジン及びセリン残基領域のcDNAに基づいて2つのPCR-プライマーを合成し、マウスの海馬から調製したmRNAより、RT-PCRを行い、新規な塩基配列を有するDNA断片を得、このDNA断片をプローブにして、上記mRNAより作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして新規な塩基配

列を含有するcDNAを得ている。また、このcDNAを含有する組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体を得、この形質転換体を培養して得られる上清からセリンプロテアーゼ活性を有するニューロプシンを得ている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、特開平8-311099号公報のマウスのニューロプシンは、脳の機能(すなわち記憶や学習機構等)の解明や脳疾患治療薬の開発が期待されるものの、マウス由来であるため、よりヒトに適したニューロプシンを開発することが望まれていた。

【0004】本発明は上記課題に鑑みなされたものであり、ヒトの脳の機能の解明や脳疾患治療薬の開発するに当たりマウスニューロプシンよりも適したヒトニューロプシンを提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段及び発明の効果】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒトのニューロプシンのcDNAをクローニングし、PCR(ポリメライゼーション・チェーン・リアクション)を用いた戦略により、その遺伝子を分析することにより、ヒトニューロプシンのアミノ酸配列、塩基配列、遺伝子構造を明らかにすると共に、ヒトニューロプシンに適したプライマーを設計し合成した。

【0006】即ち、本発明の第1は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示されるヒトニューロプシンである。本発明の第2は、ヒトニューロプシンをコードするヒトニューロプシンのDNA配列であり、配列表の配列番号1の塩基配列で示されるDNA配列である。本発明の第3は、ヒトニューロプシンの遺伝子であり、6つのエクソンと5つのイントロンからなり、前記6つのエクソンはそれぞれ配列表の配列番号1の塩基配列の1～26番、27～104番、105～264番、265～527番、528～661番、662～868番の遺伝子であり、また、プロモータ領域が配列表の配列番号2の塩基配列で示される遺伝子である。本発明の第4は、配列表の配列番号3～10のいずれかの塩基配列で示されるヒトニューロプシンのプライマーである。

【0007】本発明の新規なヒトニューロプシンは、神経系の細胞の増殖、情報伝達、さらには脳の機能(記憶や学習機構等)などに関する研究に貢献すると考えられる新規なタンパク質であり、ヒトへの適合性に優れているため、脳疾患治療薬やこのヒトニューロプシンのポリペプチドに対する抗体を用いる臨床診断試薬などとして利用可能であるという効果が得られる。また、末梢組織(脾臓、胸腺など)に存在するヒトニューロプシンは免疫などの機能に関係すると考えられ、免疫疾患治療薬として利用可能であるという効果が得られる。また、ヒトニューロプシンのアミノ酸配列をコードするそのDNA

配列を含有するベクターで形質転換された形質転換体を培養し、この培養物からヒトニューロプシンを採取することにより、有用なニューロプシンの大量供給が可能になるという効果が得られる。一方、本発明の第4は、例えばPCRプライマーとして使用することによりヒトニューロプシンを簡単に増幅できる。

【0008】

【発明の実施の形態及び実施例】以下、本発明の好適な実施例について詳述する。なお、cDNA及びDNAの

増幅に用いたすべてのオリゴヌクレオチドを表1に示し、また、市販のAP1及びAP2を除くオリゴヌクレオチドを配列表の配列番号3～10に示した。また、配列分析とアラインメントはパッケージソフト「ジーンワークス (GeneWorks)」（インテリジェネティクス社 (IntelliGenetics)）を用いて行った。

【0009】

【表1】

<増幅に用いたオリゴヌクレオチドの一覧>

オリゴ	配 列	cDNAの位置
1S	GTGACCCCGCCCTGGATT	1-19
59AS	CCGCACGAGGTCGGGGCGTCCCAT	59-35
431S	GGGTCCAAAGTGAAGCCAT	431-450
481AS	GCCAGGCTGGGTGCAATGAT	481-482
587S	GAGGATGCTTACCCGGGCGAGAT	587-609
637AS	GCTGCCTGCACAGACCATGCCATCT	637-613
736AS	CCCACAGGGGTCTGAGCCCAGGAT	736-712
842AS	GGGAGATCTAGTGCCTATCCTA	842-821
AP1	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	
AP2	ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC	

【0010】(1)ニューロプシンcDNAのRACE (ラピッド・アンプリフィケーション・オブ・DNA・エンズ (rapid amplification of DNA ends)、DNA末端の高速増幅法) ESTクローンの1つであるジーンバンクアクセスNo. AA102333 (539bp) は、BLASTプログラム (J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) を用いたデータベース検索によってマウスニューロプシンのcDNAの配列と有意な相同性を持っている。このESTクローンのデータベース配列情報に基づき、5' RACEの2つのプライマー、736AS及び637ASを設計し合成した。なお、ESTとはエクスプレスト・シーケンス・タグ (expressed sequence tag)、bpは塩基対 (base pair)、BLASTとはベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール (Basic Local Alignment Search Tool) である。

【0011】5' RACE反応は2回行ったが、5 μ lのヒト海馬のマラソン レディ cDNA (Marathon Ready™ cDNA (クローンテック社 (Clontech))) をテンプレートとして用いた。反応混液及びPCRの条件は取扱説明書に従った。プライマーはAP1 (クローンテック社) 及び736AS (各0.2mM) を使用した。増幅産物はアガロースゲルで分離し、ナイロンメンブレンに移してアルカリにし、[γ -³²P] ATPをラベルしたインターナルオリゴDNA、431Sと融合した。陽性シグナルのサイズ (約650bp) 付近のバンドはアガロースゲルで精製し、小分けして2回目のPCR反応に用いた。2回目のPCR反応は同じ反応混液及び条件で行ったが、プライ

マーはAP2 (クローンテック社) 及び637ASを用いた。650bpの増幅された分画はpGEM-T イーザーベクター (pGEM-T Easy Vector (プロメガ社 (Promega))) にサブクローニングし、配列を決定した。その配列は、配列表の配列番号1の塩基配列の1-637番を含んでいた。

【0012】5' RACE産物の配列情報及びESTクローンの配列情報に基づき、3' RACE用の2つのプライマー、431S及び587Sを設計し合成した。

3' RACE反応は2回行った。3' RACEの反応混液は1回目の5' RACEのPCRと同じだが、プライマーはAP1及び431Sを用いた。反応は94℃で30秒、60℃で30秒及び72℃で1分15秒のサイクルを30回行った。2回目のPCRにおいてはテンプレートとして最初のPCR産物全体の1/500を用い、587S及びAP2をプライマーとして用いた。反応のサイクルは最初のPCRと同じ条件で行った。3' RACEで増幅された450bpの分画はpGEM-T イーザーベクター (前出) にサブクローニングして配列を決定した。その配列は、配列表の配列番号1の塩基配列の587-868番を含み、その後にポリA配列 (約100ベース) が付いていた。このように、長いポリA配列があることが見いだされたことから、3' 末端が確認された。

【0013】これらの配列情報からすべてのORF (オープン・リーディング・フレーム (open reading frame)) をカバーするcDNAの増幅のための特異的なプライマー、1S及び842Sを設計し合成した。

(2) RT-PCR (逆転写PCR)

すべてのRNAは一段RNA抽出法 (Anal. Bio

chem. 162, 156-159 (1987)) によりヒトのケラチノサイト1次培養液から調製した。トータル5 μ gのRNAを1 μ g オリゴ dT及び10U AMV リバーストランスクリプターゼ(プロメガ社)を含む25 μ lの溶液(50mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.5mM スペルミジン, 10mM ジチオスレイトール)中で逆転写した。反応は42°C、1時間で行った。続くPCR反応は10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001%ゲラチン及び5U アンプリタック(AmpliTaq, パーキンエルマー社(Perkin Elmer))の溶液中で20pmolのプライマーペアを用いて行った。上流のプライマーは1Sを用い、下流のプライマーは842ASを用いた。反応は94°Cで15秒、57°Cで15秒及び72°Cで90秒のサイクルを30サイクル行った。増幅した分画をpGEM-T イージーベクター(前出)に連結し、配列を決定した。

【0014】(3) ヒトニューロプシンの配列分析
ケラチノサイト培養液からのRT-PCR産物の配列は、海馬cDNAから得たRACE産物と完全に一致した。その配列を配列表の配列番号1に示す。この配列の結果から、cDNAは868bpの長さであり、コザックモチーフ(J. Cell Biol. 115, 887-903 (1991))を満足する推定上の翻訳開始コドン(配列番号1の35~37番のATG)をコードしていることが明らかとなった。この翻訳開始部位と共に、このcDNAは260アミノ酸からなるタンパク質を作るための単一の780bpのORF(配列番号1の34~813番の塩基配列)を有している。

【0015】配列番号1の338~868番の塩基配列に対応するESTクローン(AA102333, 539bp)との配列比較によって、cDNAとESTクローンとの間に3つのミスマッチがあることが明らかとなった。データベース検索によってこのcDNAがマウスのニューロプシンと72%の相同性があり、ジーンバンク中の他のすべての配列は45%未満の相同性しか持たないことが明らかとなった。このことから、このcDNAがニューロプシンのヒトホモログつまりヒトニューロプシンであると判定した。

【0016】ヒトニューロプシンのcDNAはマウスのニューロプシン(J. Neurosci. 15, 5088-5097 (1995))よりも454bp短い。この違いは主として5'側の非翻訳領域が短いことによる。ヒトニューロプシンのcDNAはヒトカリクレインmRNAと45%、ヒトトリプシノーゲンのmRNAと32%の相同性を持つ。

【0017】(4) ヒトニューロプシンの推定アミノ酸配列

図1は、ヒトニューロプシン及び他のセリンプロテアーゼの配列のアラインメントを示す説明図である。アミノ酸レベルでは、ヒトのニューロプシンはマウスのニューロプシンと72%の相同性を持ち、ヒトのアプレロカリクレインと40%、ヒトのプレトリプシノーゲンと38%の相同性を持つ。推定されたアミノ酸配列のN末端には多分シグナル配列と思われる疎水領域があった(図2参照)。

【0018】ヒトニューロプシンのシグナルペプチダーゼによる推定上のプロセッシング部位はアミノ酸配列の28番目のA1aまでのC末端であり、活性化のために、ほとんどのトリプシントタイプのセリンプロテアーゼで見られるように、さらに同32番目のリジンのプロセッシングが起こる。これら推定上のプロセッシング部位の残基はヒトとマウスの間で保存されている。従ってヒトニューロプシンは多分マウスニューロプシンで見られるのと同様なメカニズムによってプロセスされる。

【0019】プロテアーゼ活性のために必要な必須の3つの残基(ヒトニューロプシンのアミノ酸配列の73番目のHis, 同120番目のAsp, 同212番目のSerであり、図1においてアスタリスクで表示した)が各アミノ酸配列の間で保存されている。ヒトニューロプシンは活性化セリン残基までアミノ末端から6残基の位置にAsp残基を持っている。このことはヒトニューロプシンがマウスニューロプシンで見られたのと同様に、P1部位の塩基性アミノ酸に基質特異性をもっていることを示唆している。ヒトニューロプシンは、N末端にリンクしたグリコシレーション部位(配列番号1のアミノ酸配列の110~112番)を持っており、これも又ヒトとマウスの間で保存されている。すべてのCys残基(推定される成熟蛋白中に13残基)はヒトとマウスの間で完全に保存されている。これらのCys残基のうち、12のCys残基が分子内ジスルフィド結合に含まれているらしい。しかし、108番目のCysはマウス及びヒトニューロプシン及びトリプシンのアラインメントに由来しないように思われる。興味深いことに、細胞溶解性T細胞において発現するセリンプロテアーゼであるグランザイムAにおいてよく知られているPXPCY配列(図3の囲み参照)-これは対応するCysにおいてホモダイマーを形成する-が、このフリーのCys(108番目のCys)に接している。このようにCys残基はグランザイムAで起こるようにホモダイマーを形成するように潜在的にジスルフィド結合が可能である。マウスニューロプシンにおいては対応する領域はQHPCY(図1参照)であり、これもまたこのモチーフに類似している。

【0020】ここで、配列番号1に示したヒトニューロプシンのcDNA配列とその予想されるアミノ酸配列につきまとめると、DNAは868bpの長さであり、260aaのアミノ酸残基のORFを含む。塩基配列の3

1~38番のCACCATGG、アミノ酸配列の110~112番のAsn Ser Ser、塩基配列の845~850番のAATAAAはコザック配列であり、それぞれ推定上のグリコシレーション部位及びポリアデニレーションシグナル配列である。アミノ酸配列の73番目のHis、120番目のAsp、212番目のSerはトリプシンタイプのセリンプロテアーゼのキー配列を示す。206番目のAspはトリプシン様プロテアーゼの基質特異性を示す。

【0021】(5) PCRによるヒトニューロアシン遺伝子のイントロンの増幅

ヒトニューロアシン遺伝子中のイントロンを増幅するため一連のPCRを行った。標準的なプロトコル("Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed." Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に従って健康なボランティアの白血球から調製された160ngのヒトゲノミックDNAをテンプレートとして用いた。PCR反応は20pmolのプライマーのペアを含む溶液(10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001%ゼラチン及び5U アンプリタック(前出)中)で行った。プライマーのペアは1Sと481AS、431Sと637AS、及び587Sと842ASのペアを用いた。反応は94℃で15秒、57℃で15秒及び72℃で3分のサイクルを30サイクル繰り返した。

【0022】この結果、1Sと481S、431Sと637AS及び587Sと842ASを用いたPCRにより、それぞれ、1.5kbp、2.2kbp及び1.8kbpの産物がそれぞれ産生された。増幅された分画をpGEM-T イージーベクター(前出)に連結し、配列を決定した。

【0023】配列分析によりこの遺伝子が6つのエクソンと5つのイントロンからなることが明らかになった。図4は、ヒトニューロアシン遺伝子の塩基配列を表す説明図である。イントロン4及び5の配列は完全には明らかになっていないが、およそのサイズを()内に示す。最初のイントロンつまりイントロン1は5' 非翻訳領域を分けており、残り4つのイントロン(イントロン2~5)はコード配列を分断している。エクソン2~6の長さはそれぞれ78bp、160bp、263bp、134bp及び207bpであった。イントロン1、2、3、4及び5の長さはそれぞれ0.3、0.5、0.2、2.0及び1.5kbであり、すべてのイントロン/エクソン結合はgt-agルールにしたがっていた。従って、遺伝子はトータルで5.4kbにわたっていた。

【0024】ヒトニューロアシン及びトリプシンタイプのプロテアーゼのゲノム構成は非常に良く似ており、コ

ーディング領域の中ではヒトニューロアシンの遺伝子構成はトリプシンファミリーの遺伝子のそれと同一である。図5はヒトニューロアシン遺伝子及びいくつかの他のセリンプロテアーゼのゲノム構成を示す説明図である。図5においてエクソンは四角で囲み、コード領域は黒で示した。活性基のアミノ酸残基His、Asp及びSerの位置を、それぞれH、D、Sで示した。ローマ数字はコドンの一番目(I)、二番目(II)あるいは三番目(III)のヌクレオチドに続くかどうかによってリーディングフレームに関するイントロンの相を示す。上記(4)で述べたように、アミノ酸レベルではヒトニューロアシンはプレトリプシノーゲンとプレプロカリクレインに最も良く似ており、これらはどちらもトリプシンファミリーに属している。このことから、ヒトニューロアシン遺伝子及びトリプシンファミリーの遺伝子は共通の祖先に由来すると思われる。

【0025】ヒトニューロアシンの遺伝子の一つのユニークな特徴は、最初のイントロンの位置である。というのは、これまでのトリプシンタイプのセリンプロテアーゼの遺伝子には、この位置にはイントロンが報告されていなかったからである。

(6) ヒトニューロアシン遺伝子のプロモータ領域
ヒトニューロアシン遺伝子のプロモータ領域を解析するために、5' フランキング領域(flancking region)の高速増幅を行った。まず、5μlのヒトゲノミックDNAをEcoRVで消化した。消化したDNAへのアダプタの付加は10μlの20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM MgCl₂, 1mM ジチオスレイトール, 1mM ATP, 5% ポリエチレングリコール1及び2U T4 DNAリガーゼ溶液中で2μlの10μM マラソン cDNA アダプタ(マラソンTM cDNAシンセシスキット、クローンテック社)を用いて20℃で3時間行った。続くPCR反応は100番目のリゲーション混合物をテンプレートとして用いて行った。反応混液は50μlのAP1及び736ASの0.2mMプライマーペア、1×LA PCR バッファII(タカラ社)、1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP及び5U LATaq(タカラ社)を用いた。PCRのパラメータは94℃で1分の後94℃で15秒、72℃で10分を5サイクル行った後、94℃で15秒、70℃で10分を5サイクル、94℃で15秒、68℃で10分を25サイクル行った。反応液の1/500希釈を2回目のPCRのテンプレートとして用いた。2回目のPCR反応は同じ反応混液で行ったが、プライマーペアはAP2及び637ASを用いた。PCRのサイクルは1回目のPCRサイクルと同じであった。反応混液はアガロースゲル上で電気泳動し、pGEM-T イージーベクター(前出)にサブクローニングして、cDNA 5' 末端の上流トータル1099bpの配列を決定した。その配列を配列表の配列

番号2に示す。

【0026】この配列につき、-982bpまで典型的なTATAboxあるいはCCAAT配列も見つからなかったが、弱いTATA box様の配列TTAAAAが-71から-76の位置に見つかり、-993から-997にCCAATモチーフが観察された。プロモータ領域には二つの繰り返しの配列が存在した。CTCCTCCTCAの配列は5回(-198から-208、-347から-357、-456から-466、-497から-507及び-534から-544まで)、TCCAGGCCCCCAGCが2回(-323から-336及び-360から-373まで)現れた。この二つの繰り返しの配列はどちらもよく知られたコンセンサス翻訳因子結合配列である。潜在的な翻訳因子結合配列をMatInspector (Nucleic Acids Research 23, 4878-4884 (1995)) でサーチした。推定上の調節因子の中に、STATx結合モチーフであるTTCCCA/GG/TAAが-136から-144の位置に、AP-2, CCCCNGGCが-125から-132の位置に見いだされた (Genes Dev. 5, 670-682 (1991); Genes Dev. 9, 984-994 (1995))。

【0027】(7) ノーザンブロットハイブリダイゼーション

トータルRNAを変性アガロースゲル中で電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写した。[α - 32 P] dCTPでラベルしたプローブは5' RACEで増幅した650bp DNA分画からランダムプライミングによって作製した。ハイブリダイゼーションは文献 (J. Neurosci. 15, 5088-5097 (1995)) に従って行った。

【0028】図6は、ヒトケラチノサイトの培養液のノーザンブロット分析結果を表す説明図である。この図6において、トータル20 μ gのRNAを用いた。RNA

は1%フォルムアルデヒド-アガロースゲルで分離してナイロンメンブレンに転写し、 32 Pでラベルした650bpのRACE産物で釣り上げた。28S及び18SリボソームRNAのバンドの位置を示した。

【0029】このノーザンブロットによる分析によってニューロブシンのmRNAが培養ケラチノサイトに発現していることが証明された。0.9kbの位置に単一の陽性バンドが観察された。このことは、マウスのニューロブシンがケラチノサイトに覆われた皮膚の上皮組織や上部消化管において強く発現しており、その発現は成長過程においてケラチノサイトがもっとも活発な時期に強かったことから、ケラチノサイト培養中の成長細胞が大量のヒトニューロブシンを発現していることと一致している。

【0030】(8) サザンブロットハイブリダイゼーション

ヒトのゲノミックDNAをBamHI, EcoRI, PstI及びXbaIで消化し、0.7%アガロースゲルで分離した。さらにアルカリ溶液中で変性させ、ナイロンメンブレンに転写した。ハイブリダイゼーションのプローブはノーザンブロットハイブリダイゼーションで用いたDNA分画と同じものを用いた。図7は、ヒトゲノムDNAのサザンブロットハイブリダイゼーション分析結果を表す説明図である。図7において、各レーンはBamHI (レーン 1)、EcoRI (レーン 2)、PstI (レーン 3) 及びXbaI (レーン 4) で消化した10 μ gのDNAを含む。

【0031】サザンブロットはコード領域のほとんどを覆っているcDNAを用いて行った。ハイブリダイゼーションの結果単一若しくは少数のバンドが各レーンに認められ、このことはヒトニューロブシン遺伝子が単一コピーの遺伝子であることを示唆している。

【0032】

【配列表】

配列番号: 1
 配列の長さ: 868
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 二本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: cDNA to mRNA
 配列
 GTGACCCCGC CCCTGGATTC TGGAAGACCT CAC 33
 CAT GGG ACG CCC CCG ACC TCG TGC GGC CAA GAC GTG GAT GTT CCT GCT 81
 Met Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Ala Lys Thr Trp Met Phe Leu Leu
 5 10 15
 CTT GCT GGG GGG AGC CTG GGC AGG ACA CTC CAG GGC ACA GGA GGA CAA 129
 Leu Leu Gly Gly Ala Trp Ala Gly His Ser Arg Ala Gln Glu Asp Lys
 20 25 30
 GGT GCT GGG GGG TCA TGA GTG CCA ACC CCA TTC GCA GCC TTG GCA GGC 177

```

Val Leu Gly Gly His Glu Cys Gln Pro His Ser Gln Pro Trp Gln Ala
      35              40              45
GGC CTT GTT CCA GGG CCA GCA ACT ACT CTG TGG CGG TGT CCT TGT AGG 225
Ala Leu Phe Gln Gly Gln Gln Leu Leu Cys Gly Gly Val Leu Val Gly
      50              55              60
TGG CAA CTG GGT CCT TAC AGC TGC CCA CTG TAA AAA ACC GAA ATA CAC 273
Gly Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Lys Tyr Thr
      65              70              75              80
AGT ACG CCT GGG AGA CCA CAG CCT ACA GAA TAA AGA TGG CCC AGA GCA 321
Val Arg Leu Gly Asp His Ser Leu Gln Asn Lys Asp Gly Pro Glu Gln
      85              90              95
AGA AAT ACC TGT GGT TCA GTC CAT CCC ACA CCC CTG CTA CAA CAG CAG 369
Glu Ile Pro Val Val Gln Ser Ile Pro His Pro Cys Tyr Asn Ser Ser
      100              105              110
CGA TGT GGA GGA CCA CAA CCA TGA TCT GAT GCT TCT TCA ACT GCG TGA 417
Asp Val Glu Asp His Asn His Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Arg Asp
      115              120              125
CCA GGC ATC CCT GGG GTC CAA AGT GAA GCC CAT CAG CCT GGC AGA TCA 465
Gln Ala Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Pro Ile Ser Leu Ala Asp His
      130              135              140
TTG CAC CCA GCC TGG CCA GAA GTG CAC CGT CTC AGG CTG GGG CAC TGT 513
Cys Thr Gln Pro Gly Gln Lys Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Val
      145              150              155              160
CAC CAG TCC CCG AGA GAA TTT TCC TGA CAC TCT CAA CTG TGC AGA AGT 561
Thr Ser Pro Arg Glu Asn Phe Pro Asp Thr Leu Asn Cys Ala Glu Val
      165              170              175
AAA AAT CTT TCC CCA GAA GAA GTG TGA GGA TGC TTA CCC GGG GCA GAT 609
Lys Ile Phe Pro Gln Lys Lys Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Gly Gln Ile
      180              185              190
CAC AGA TGG CAT GGT CTG TGC AGG CAG CAG CAA AGG GGC TGA CAC GTG 657
Thr Asp Gly Met Val Cys Ala Gly Ser Ser Lys Gly Ala Asp Thr Cys
      195              200              205
CCA GGG CGA TTC TGG AGG CCC CCT GGT GTG TGA TGG TGC ACT CCA GGG 705
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asp Gly Ala Leu Gln Gly
      210              215              220
CAT CAC ATC CTG GGG CTC AGA CCC CTG TGG GAG GTC CGA CAA ACC TGG 753
Ile Thr Ser Trp Gly Ser Asp Pro Cys Gly Arg Ser Asp Lys Pro Gly
      225              230              235              240
CGT CTA TAC CAA CAT CTG CCG CTA CCT GGA CTG GAT CAA GAA GAT CAT 801
Val Tyr Thr Asn Ile Cys Arg Tyr Leu Asp Trp Ile Lys Lys Ile Ile
      245              250              255
AGG CAG CAA GGG
Gly Ser Lys Gly
      260
CTGATTCTAG GATAAGCACT AGATCTCCCT TAATAAACTC ACAACTCTCT GGTTC 868

```

配列番号 : 2

配列の長さ : 1099

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

GTAGAGCTCA GCCCCTTGTC GCCCGTCCT GGGCGTGTGC TGGGTTTGAA TCCTGACGGA -1040
 GACCTGGGGG GAAATTGAGG GAGGCTCTGG ATACCTTTAG AGCCAATGCA ACGGATGATT -980
 TTTTCAGTAAA CGCGGAAAC CTCACCTTCT TTCTGCCTGA GCTGTGAGAT GAGTGGAGAG -920
 CAAACGGTTG GCGGTGAAG GGCAGATGAG GGAACCGTA CCGCCTTGCA ACTCCCCCTT -860
 AAACCCCTAG TAAGTTTTC CTAAGTCTC TGTCCATCAG CCCTATTGCA GCAAGACTCC -800
 TGGGTTCTGC TTGGGTTGGT CTTGCCGCCT CCAGGGGAAG GGGAAACCAG GTCACAGTGC -740
 CTCCCAAACC TGCCCTCCCA GATCCCGGAC CTCTCAGGGG ACAGCGGGCG GGGCCTGATC -680
 CACCCTCTGG TTTCTGACCC TAGAAAACCT GCCTTTCTTC GGTTCCTGGT TACTGGCAGC -620
 AGCCCCCTCC TCCCACAAAA GATCAGGTTC CAAGCTTCTC CTTTAAAAG TACTTAGAAT -560
 TTAGCCCCCA GCTCTCTCCT CCCTCACACC CAGGAATCCA GGCCCCTAGC CCTCCTCCCC -500
 TCAGACCCAG GAGTCTGGC CCCTAGCAGC CCCCTCCTCC CTCAGACCCA GGAGTCTGGG -440
 CCCCAGCCC CTCCTCGTC AGACCTAAAT CCCAGGTCCC AGTCCCTCCT CCCTTAGATT -380
 TAGGAGTCCA GGCCCCCAGC CTCTCCTCCC TCAGACCCAG GAATCCAGGC CCCCAGCTTC -320
 CTCCCCTCTC AGAACTAAAA TCTTGGCCCC CAGCCCTTTA TGTTTCAGAT CCTAGAGTCT -260
 CAGCACGAG TCCCTCCTCT CCCTAGCCTC AGGAGTCTGA GATTCCAGCC CTCCTCCCT -200
 CAAGATTTC CGTTCAATCC CCTCGCCCC TTCTCACTCA CACCCAGTGT TCCAGTTCCC -140
 AGAAGCTCCC CAGGCTCTAG TGCAGGAGGA GAAGGAGGAG GAGCAGGAGG TGGAGATTCC -80
 CAGTTAAAAG GCTCCAGAAT CGTGTACCAG GCAGAGAACT GAAGTACTGG GGCCTCCTCC -20
 ACTGGGTCCG AATCAGTAG -1

配列番号: 3

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー1s)

アンチセンス: NO

フラグメント型: N末端

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの1-19番に相当する。

配列

GTGACCCCGC CCCTGGATT

配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー59AS)

アンチセンス: YES

フラグメント型: 中間

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの59-35番に相当する。

配列

CCGCACGAGG TCGGGGGCGT CCCAT

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー431S)

アンチセンス: NO

フラグメント型: 中間

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの431-450番に相当する。

配列

GGGTCCAAAG TGAAGCCCAT

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー481AS)

アンチセンス: YES

フラグメント型: 中間

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの481-462番に相当する。

配列

GCCAGGCTGG GTGCAATGAT

配列番号: 7

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー587S)

アンチセンス: NO

フラグメント型: 中間

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの587-609番に相当する。

配列

GAGGATGCTT ACCCGGGGCA GAT

配列番号: 8

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー637AS)

アンチセンス: YES

フラグメント型: 中間

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの637-613番に相当する。

配列

GCTGCCTGCA CAGACCATGC CATCT

配列番号: 9

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー736AS)

アンチセンス: YES

フラグメント型: 中間

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの736-712番に相当する。

配列

CCCACAGGGG TCTGAGCCCC AGGAT

配列番号: 10

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (プライマー842AS)

アンチセンス: YES

フラグメント型: C末端

他の情報: ヒトニューロプシンのcDNAの842-821番に相当する。

配列

GGGAGATCTA GTGCTTATCC TA

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトニューロプシン及び他のセリンプロテアーゼの配列のアラインメントを示す説明図である。

【図2】 ヒトニューロプシンの疎水プロットを示すグラフである。

【図3】 ヒトニューロプシン及びヒトグランザイムAのアラインメントを示す説明図である。

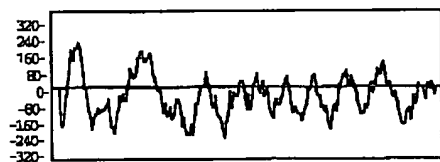
【図4】 ヒトニューロプシン遺伝子の塩基配列を表す説明図である。

【図5】 ヒトニューロプシン遺伝子及びいくつかの他のセリンプロテアーゼのゲノム構成を示す説明図である。

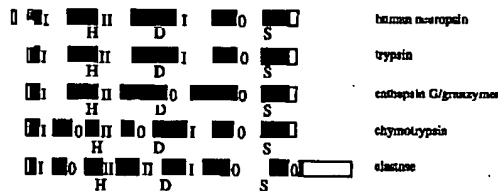
【図6】 ヒトケラチノサイトの培養液のノーザンブロットハイブリダイゼーション分析結果を表す説明図である。

【図7】 ヒトゲノムDNAのサザンブロットハイブリダイゼーション分析結果を表す説明図である。

【図2】

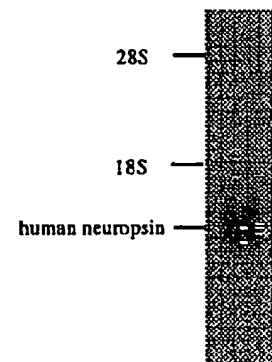


【図5】



human neuropeptide/ヒトニューロプシン
 trypsin/ラットトリプシン
 cathepsin G/granzymes/ヒトカタペプシン
 chymotrypsin/キモトリプシン
 elastase/ラットエラスターゼ

【図6】



【図1】

human neuropsin	MGRPRERRAAK	TWTLILLGS	AWAGHSRAQE	DKVLGGHECO	PHSQPWQAAL	50
mouse neuropsin	MGRPPPCAIIQ	FWLLILLFMG	AWAGITRAQG	SKLLGPRECI	PHSQPWQAAL	50
kallikrein	M---W-PLV-	--LQALSLG	G-TEAAPPQ	SRIVGGNECE	PHSQPWQAAL	42
gamma-NGF	M---W-PLI-	--LPLALSLG	G-IDAAPPVQ	SRIVGGFKCE	KNSQPWVAV	42
pretrypsinogen	M---NPLLI-	--LTFV--AA	A-LAAPFDDN	DKIVGGYNCE	ENSPPVQVSL	41
human neuropsin	FGGQQLLCGG	VLVGNNWVLT	AAHCKKPKYT	VRLGNHSTQN	KDGPEQETPV	100
mouse neuropsin	FGGERLLCGG	VLVGDRWVLT	AAHCKKKQYS	VRLGNHSLQS	RDPPEQETQV	100
kallikrein	YHFSTFOCGG	TLVHRQWVLT	AAHCLSNKQ	LWLGRHLPD	DENTADPVHV	92
gamma-NGF	YRYTQLCGG	VLDPNWVLT	AAHCYDNKK	VHLGNHLPK	DEPSADHRFV	92
pretrypsinogen	NSQYHF-CGG	SLINEQWVVS	AGHCYKRIQ	VRLGTHNTEV	LEENQETNA	90
human neuropsin	VQSIHPHCYN	SSDVEDH---	---NHDLM	LLQIRDQAS-	LGSVKVFISL	141
mouse neuropsin	AQSIHPHCYN	NSNPEDH---	---SIDIM	LRLQNSAN-	LGDVKVPQL	141
kallikrein	SESPHPGCFN	MSLLENHTRQ	ADEHYSHDL	LLRLTEPADT	ITDAVKVVEL	142
gamma-NGF	SKALPHPGFN	MSLMRKHTRF	LEYDYSNDLM	LLRLSKPAD-	ITDTVKPITL	141
pretrypsinogen	AKIIRHPQFD	RKTL-----	---NNDIM	LKLSSRAY-	INARVSTLSL	128
human neuropsin	ADHCTQPPQOK	CLISGWTVT	SPRENFPDIL	NCAEVKTFQ	KKCEDAYFGQ	191
mouse neuropsin	ANLQPKVQOK	CLISGWTVT	SPRENFPDIL	NCAEVKITSO	NKCEAYPGK	191
kallikrein	PTEEPVQST	CLASGWSIE	PENFSFPDDL	QVLDLKLIN	DECKKAHVQK	192
gamma-NGF	PTEEPKLQST	CLASGWSIT	PTKQFPTDDL	YCVNLKLEN	EDAKAHIEK	191
pretrypsinogen	PTAPPATGFK	CLISGWNIA	SSGADYFDEL	QLDAPVLSQ	AKCEASYPGK	178
human neuropsin	ITDGMVCAGS	SKGA-DTCQG	DSGGPLVCDG	ALQGITSWGS	DPCGRSDKPG	240
mouse neuropsin	ITEGMVCAGS	SNKA-DTCQG	DSGGPLVCDG	MLOGITSWGS	DPCGKPEKPG	240
kallikrein	VTDPMLCVGH	LEGGKOTCVG	DSGGPLVCDG	VLOGITSWGY	VPCGTPNKPE	242
gamma-NGF	VTDAMLCAGE	MDGGKOTCVG	DSGGPLVCDG	VLOGITSWGH	TPCGEPNMPG	241
pretrypsinogen	ITSNMPVVEF	LEGGKDSQCG	DSGGPLVCDG	QLOGVSWGD	G-LNOKNKP	227
human neuropsin	VYIKICRYLD	WIKKIDPSKG				260
mouse neuropsin	VYIKICRYFT	WIKKIMDNRD				260
kallikrein	VAVRVLSYVK	WIEDTIAENS				262
gamma-NGF	VYTKLNKETS	WIKDTMAKNP				261
pretrypsinogen	VYTKVYNKYK	WIKNTIAANS				247

human neuropsin/ヒトニューロブシン

mouse neuropsin/マウスニューロブシン

kallikrein/ヒトのプレプロカリクレイン

gamma-NGF/ γ -NGF (神経成長因子)

pretrypsinogen/ヒトのプレトリプシノーゲン

なお、アミノ酸配列は1文字記号で表した。

【図3】

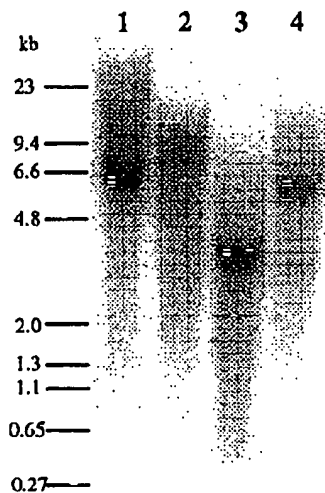
human neuropsin	MCRPRPRAAK TWMFLLLLCG AWAGHSRAQE DKVIAGGHECQ PHSQPWQAAL	50
granzyme AIIGGNEVT PHSRPYMVLL	18
human neuropsin	FQCQQLCCG VLVCGNWVLT AAHCK-KPKY TVRIAGDIISLQ NKDGPEQEIP	99
granzyme A	SLDRKTICAG ALIAKDWVLT AAHCNLNKRS QVILGAHSIT REEPTKQIML	68
human neuropsin	VVQSI[PHPCY]NSSDVEDHNH DLMLLQLRUQ ASLGSKVKPI SLADHCTQ--	147
granzyme A	[VKKEF]PYPCYDPATREG--- DLKLLQLTEK AKINKYVTIL HLPKKGDDVK	115
human neuropsin	PGQKCTVSCW GTVTSPRENF PDTLNCAEVK IFPQKKCED- ---AYPGQIT	193
granzyme A	PGTMCQVAGW GR-THNSASW SDTLREVNIT IIDRKVCNDR NHYNFNPVIG	164
human neuropsin	DGMVCAGSSK GA-DTCQGDS GGPLVCDGAL QGITSNGSU- PCGRSDKPGV	241
granzyme A	MMMVCAAGSLR GGRDSCNGDS GSPLICEGVF RGVTSFGLEN KCGDPRGPGV	214
human neuropsin	YTNIC-RYLD WIKKIIGSKG	260
granzyme A	YILLSKKHLN WIIMTIKAV	234

human neuropsin/ヒトニューロプシン

granzyme A/グランザイムA

なお、アミノ酸配列は1文字記号で表した。

【図7】



【図4】

(177-1)

GTGACCCCGCCCTGGATTCTGGAAG

(177-1)

gtgagggtgcagagggtactcagatagacatcaggccccgaccctccttctccagattccaggacccagcct
cagatgcccttctctgtcagatccagcagctctggaccccgcttctcctctccctaatctaggagtccca
gctcccagctccctgtccctcagaccagacatcgaggactccccctcccttggatgtaggatccagt
ccccagctcctccttctccagagaagccagaaagccccagatactctcggtgcctccccagtgccc
aaatccagaactgggagctcaggctcctccttctgtttaccgccccgcccctctccatttccag

(177-2)

ACCTCACCATTGGGACGCCCCGACCTCGTGGGCCAAGACGTGGATGTTCTCTCTTGTCTGGGGGAGCCT
GGGCAG

(177-2)

gtgaggagggttgcggaggcctccggaggaggaggtatgaaggcagcagtgccgctggggagctctgtggga
atgcccggggggtatgtgggtgcgtgtgcacggatgtgaagagtgcgatacgggtgcaggagcctctgtggg
cttctcctcagggtggacagaggcaagaacaggtagcagcaggtaggagtaggttccgtgatgtgttaatt
gtctgaatagctacagccttgggggctgcttgccttgggggcaatgattcacctgggagtagacggggcctg
tagactcatgtggaagcagtgaggacattcttgggtgtgtactcttlatgtatgacacatggactgaai
gagtgccccgtgtggcagcgttggaacctggacctctcacaaagttgtatgcggagaacttgcggtgtg
tccatttgaaccacagtgcccttcccacctcgactgcaccagagggtggcgaaccaacctctccctcc
tgtgcag

(177-3)

GACACTCCAGGGCACAGGAGGACAAGGTGCTGGGGGTCATGAGTGCCAAOCCCATTCGCAGCCTTGGCAGG
CGCCTTGTTCAGGGCCAGCAACTACTCTGTGGCGGTGTCTGTAGGTGGCAACTGGGTCTTACAGCTG
CCCACTGTAAAAAAC

(177-3)

gtgagtggatgatgggggcagagggtcagctggggcttaaggaaagaggggctgggtttcgactcaggaag
gagagagctgaggactggactcctgggtctgaaggaggaggggctgggggcaataccctgcctgggtccc
aaactatccccaccattacg

(177-4)

GAAATACACAGTACGCCTGGGAGACCACAGCCTACAGAATAAAGATGGCCAGAGCAAGAAATACCTGTGGT
TCAGTCCATCCACACCCCTGCTACAACAGCAGCGATGTGGAGGACCACAAACATGATCTGATCTCTTCA
ACTGCGTGACCAGGCATCCCTGGGGTCCAAAGTGAAGCCATCAGCCTGGCAGATCATTGCACCCAGCCTGG
CCAGAAGTGCACCGTCTCAGGCTGGGCACTGTCAACAGTCCCCGAG

(177-4)

gtagtgggttgtccactaatgggagggagagagagctgggtggccagtg...(~1.5 kb)...atgg
aggcaagggtgtgtctctcagggaaaccttacaaccttccccctcag

(177-5)

AGAAATTTCTTCACTCTCAACTGTGCAGAAGTAAAAATCTTTCCCAGAGAAGTGTGAGGATGCTTACC
CGGGGCAGATCACAGATGGCATGGTCTGTGCAGGCAGCAGCAAAGGGGCTGACACGTGCCAG

(177-5)

glgagcaatttctgaatccttctcctcacacatccctcattgccctctcgagg...(~2.0 kb)...aggg
acgttgtggacatctcagatgcaaggctgttctcatctccctgtctag

(177-6)

GGCGATTCTGGAGGCCCTGGTGTGTGATGGTGCACCTCCAGGGCATCACATCCTGGGGCTCAGACCCCTGT
GGGAGTCCGACAAACCTGGGTCTATACCAACATCTGCCGTACCTGGACTGGATCAAGAAGATCATAGGC
AGCAAGGGCTGATTCTAGGATAAGCACTAGATCTCCCTTAATAAACTCACAACCTCTCTGTTTC

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.